メタロアッセイ　鉄測定 LS（ニトロソ PSAP 法）

（商品コード：FE01M）

取扱説明書

ver. 1.8　　2013 年 6 月 3 日改訂

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。
http://metallogenics/

【測定原理】

本法は Nitroso-PSAP と鉄とのキレート錯体形成による可視部の発色を観測し鉄濃度を求めます。トランスフェリン等の輸送タンパク質に結合している鉄を、試薬中の弱酸、変性剤により解離させ、鉄-Nitroso-PSAP 錯体を形成させます。この錯体を波長 750nm で測定することにより鉄濃度を求めることができます。

【鉄定量の意義】

鉄は重要な構成元素として多くの酵素中に含まれています。血中の鉄はすべてトランスフェリンと結合しており、ミオグロビン、ヘモグロビンなど、鉄を必要としているグロビンタンパク質の合成のため、赤芽球や各組織へ輸送されます。酸素を輸送するタンパク質の生成には鉄は不可欠であり、その欠乏は鉄分欠乏性貧血、慢性出血性貧血、感染性の貧血を引き起こします。また、肝炎、肝硬変などでトランスフェリンの増加、高濃度の鉄が観測されます。再生不良性貧血、悪性貧血なども鉄の増加を示します。

【キットの内容】

合計 200 測定分　（商品コード：FE01M ）

内容	容量
R-A　Buffer（緩衝液）	30 mL×1
R-B　Sodium ascorbate　（ｱｽｺﾙﾋﾞﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ（ 粉末））	30 mL ボトル×1
R-C　Buffer　（緩衝液）	14 mL×1
R-R　Chelate color　（キレート試液　Nitroso-PSAP）	1.5 mL×1
Iron Standard　200 μg/dL　(35.8 μM)　（鉄標準液）	1.6 mL×1

【測定試料の注意点】

1）測定試料が強酸の場合は、pH 2 以上にしてからアッセイ検体としてください。試料種によって pH 緩衝力が異なる場合があるので pH を確認し、酸添加量の最適化を推奨しています。
2）著しく懸濁している場合は遠心分離等で懸濁物を除去したものをアッセイ検体としてください。
3）測定レンジ以上の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体としてください。または多点検量線から濃度を求めて下さい。
4）本法は、その得られる数値を保証するものではありません。予め特性を確認した後、応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。
5）EDTA は測定値へ影響を与えるため使用しないで下さい。

【オペレーション】

１．試薬の準備　（用事調製）

以下の用量で R-A、R-B、R-C、R-R を清浄な容器へ分注し、発色液を調製して下さい。

R-AB 緩衝液の調製

R-ABuffer（緩衝液）の全量を R-B ボトルへ添加し、R-B 中の粉末を十分に溶解させて下さい。これを R-AB 緩衝液とします。

発色液の調製

測定検体数	1 検体あたり	（例）100 検体
R-C　Buffer　（緩衝液）	70 (μL)	7 (mL)
R-R　Chelete color（キレート試液）	7 (μL)	0.7 (mL)

測定検体数に応じて必要量を用事調製、これを発色液とします。

*R-AB 緩衝液、発色液は調製後、3 週間以内に使用してください。

鉄標準液(200 μg/dL)

そのまま使用して下さい。

２．試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇血清・血漿
そのままアッセイ検体として下さい。
◇組織抽出液、ライセート、その他の試料
塩酸、硝酸等を試料に添加し 0.01～0.1M 程度の酸試料とする。 （例：試料 1mL＋6M 塩酸 10μL） ↓ pH＞2 であることを確認しアッセイ検体とする。 *懸濁している場合は遠心分離による上清をアッセイ検体とする。

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。
*アッセイに適用できる検体は pH＞2 です。

３．アッセイと測定操作

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 250 µL 容量）

以下の用量で R-AB 緩衝液、標準液、試料、発色液を清浄なウエル、セル等へ分注して下さい。

○アッセイ

添加順 (µL)		アッセイ検体		
		試薬ﾌﾞﾗﾝｸ	鉄標準試料	試　料
1	精製水	15	-	-
	鉄標準液	-	15	-
	試　料	-	-	15
2	R-AB 緩衝液	160	160	160
↓	よく混合して下さい			
3	発色液	75	75	75
↓ 十分に混合し、室温 5 分間静置後、所定波長の吸光度を測定				

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。
但し 1,000 µg/dL 以上の試料では 2 倍～10 倍希釈したものをアッセイ検体としてください。
アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

項目	条件
測光波長（主波長）	750 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	740～760 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル or 分光測定用セル等

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウエルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計　微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。
*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用してください。

○濃度の算出

$$\frac{OD_{試料} - OD_{ブランク}}{OD_{標準} - OD_{ブランク}} \times 200 = 鉄濃度(\mu g/dL)$$

標準液濃度

$OD_{試料}$：　試料の吸光度
$OD_{標準}$：　標準試料の吸光度
$OD_{ブランク}$：試薬ブランクの吸光度

単位換算　µg/dL×0.179 = µmol/L

【主な仕様と性能】

項目	内容
感度	試薬ブランクを対照として鉄標準液（200 µg/dL）を測定した時の吸光度は 0.08～0.15 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 5%以内です。
正確性	既知濃度の血清標準物質における表示値との差は 10%以内です。
測定範囲	10～1,000 µg/dL
共存物質の参考許容範囲	抱合型ビリルビン･非抱合型ビリルビン　30 mg/dL ヘモグロビン　0.3 g/dL

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

斎藤幹彦，堀口大吉，喜納兼勇，*分析化学*, 30, 635－639（1981）

【製造販売業者】

メタロジェニクス 株式会社
千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ

問い合わせ先
メタロジェニクス株式会社　営業部
〒260-0856　千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ
TEL：　043-227-6767
FAX：　043-227-6768
e-mail：　sales@metallogenics.com
URL:　http://metallogenics.com/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://metallogenics.com/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。